

分析非标样品

细胞裂解物制备指南

本文旨在作为使用 Olink 技术制备细胞裂解产物的一般指南。本指南是针对活细胞、或离心后以颗粒形式收集的细胞进行裂解而制定的。

如果您的细胞经过防腐剂、固定剂或任何有可能使蛋白质变性的药剂/化学品处理，如 Allprotect 或 RNAlater，请联系 support@olink.com 询问。

一般准则

建议细胞裂解产物的总蛋白浓度为 0.5 - 1 mg/mL，组内的所有样品应标准化为相同的浓度。

一个由纯的裂解液组成的空白样应与样品一起分析以评估潜在的干扰（关于裂解缓冲液的建议见下文）。

为了评估潜在的过饱和蛋白（hook effect），建议每个不同处理条件下的样品组再添加分析几个包含两个浓度梯度稀释的样品。

详细指南

裂解缓冲液

为了确保裂解缓冲液与 Olink PEA 技术的兼容性，我们总结了一套标准，建议客户在选择、准备或购买裂解缓冲液时能够遵循。

与 Olink 技术相兼容的裂解缓冲液

以下缓冲液已经过测试，可以用于 Olink 检测：

- NP40裂解缓冲液
 - 终浓度: (Nonidet P40 1%, Triton X-100 0.1%, Sulfobetaine 0.1%, NaCl 150 mM, 1 X Proteinase Inhibitors from Roche (cat number 11836153001), 1X Tris-EDTA buffer pH 8.0).
- Bio-Plex细胞裂解缓冲液 (cat number 171-304011, Bio-Rad), 在使用前加入以下缓冲液: + Factors 1 and 2 (from the kit) + 蛋白酶鸡尾酒抑制剂 Protease inhibitor cocktail from Roche (cat number 11 836153001)
- M-PER 哺乳动物蛋白提取试剂 Mammalian protein extraction reagent
 - 客户将TPER（用于组织样本 Tissue protein extraction reagent）与Olink一起使用，没有任何问题。我们不认为将M-PER用于其他样品类型会有任何问题。

- RIPA 裂解液 RIPA Lysis Buffer
1x lysis buffer: 50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate.
- 市售 RIPA 缓冲液 Commercially available RIPA Buffers
— (10X) Millipore; article #20-188 (0.25% deoxycholate, 可兼容)

不兼容的裂解缓冲液

- 市售 RIPA 缓冲液
— (10X) Sigma; article # R0278 (1% deoxycholate, 不兼容)

避免在裂解缓冲液中出现以下情况：

- 浓度过高的普通洗涤剂 (~1% max of Triton, NP-40 or Tween)
- 离子洗涤剂 (~0.1% max of SDS or deoxycholate)
- 过高或过低 pH 值的重度缓冲溶液 (pH 应在生理水平左右)
- 高浓度的 EDTA (< ~25 mM)
- (导致蛋白) 变性成分
- 过高的还原剂成分 (e.g., <1 mM DTT)
- 高浓度的盐, 保持浓度低于:
 - <~250 mM NaCl
 - <25 mM KCl
 - <10 mM MgCl

蛋白酶抑制剂

蛋白酶抑制剂可以作为某一类蛋白酶 (如丝氨酸蛋白酶 serine proteases) 的单独蛋白酶抑制剂来补充, 也可以作为包含所有不同类型蛋白酶抑制剂的鸡尾酒来补充, 如 Roche (cat number 11836153001)。

裂解缓冲液中蛋白酶抑制剂常用的浓度

- 1 mM PMSF
- 蛋白酶鸡尾酒抑制剂 Protease Inhibitor cocktail (final concentration 10.4 mM AEBSF, 8 μ M Aprotinin, 0.2 mM Leupeptin, 0.4 mM Bestatin, 0.15 mM Pepstatin, 0.14 mM E-64)
- NaF concentrations range from 5-10 mM
- Na₃VO₄ at 1-2 mM concentration.

制备细胞裂解产物

用于细胞裂解的裂解液的量取决于细胞是在组织培养瓶中直接裂解，还是在离心后以颗粒形式裂解。

从粘附细胞制备细胞裂解产物

粘附的细胞可以直接在培养瓶中裂解，或用刮刀刮下后进一步进行细胞裂解处理。请注意，用酶消化（如胰蛋白酶处理 trypsin treatment）将细胞从组织培养瓶/板中分离出来，可能会导致一些细胞蛋白或生物标志物被消化掉。

我们建议在收集/裂解前彻底清洗培养的细胞（如用温热的 PBS 或 HBSS 清洗 2 次），以避免培养基蛋白质或血清的残留。

Protocol 示例: 直接裂解培养瓶中的细胞

1. 在裂解开始前，将蛋白酶抑制剂补充至裂解缓冲液。将含有蛋白酶抑制剂的裂解液放在冰上。
2. 向培养孔/组织培养瓶中加入推荐的裂解缓冲液量(见 Table 1). 确保足够体积的裂解液被加入到培养孔/瓶中，即所有细胞/细胞单层都被覆盖并被裂解。
注意：以裂解缓冲液供应商说明中推荐的最低裂解液体积开始细胞裂解。在需要时逐渐增加体积，以达到完全的裂解。
3. 在冰上孵化（例如，10 分钟或按照裂解缓冲液供应商的建议）以实现完全裂解。
4. 用细胞刮刀将细胞裂解液从培养瓶表面刮下，用 1 ml 吸管/吸头将其转移到一个干净的 Eppendorf 管中。
5. 按照裂解液供应商的建议完成提取程序。
6. 测量并调整所有提取的样品中的蛋白浓度 (0.5-1 mg/ml) . 使用相同的含有蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液调整蛋白浓度。在进行-80°C 储存之前，将样品等分到较小的体积。

Table 1. 不同培养瓶类型通常使用的裂解缓冲液体积

| Tissue culture flask | Lysis buffer volume (µl) |
|----------------------|--------------------------|
| T25 | 500-1000 |
| 6-well plate | 200-400 |
| 12- well plate | 200-300 |
| 24-well plate | 100-200 |
| 96-well plate | 50-100 |

从缓冲液中刮下的细胞制备细胞裂解产物

细胞/细胞单层可以在缓冲液（如 PBS 或 HBSS）中被刮下，并在无法计数的情况下被富集。在这种情况下，裂解缓冲液的用量可以通过填充细胞体积（Packed cell volume, PCV）来估计，即估计颗粒的大小（见 Table 2）。从这一步开始，便可使用与上述相同的 protocol。

Table 2. 基于填充细胞体积 PCV 的裂解缓冲液用量的常见建议

| Packed cell volume (μl) | Lysis buffer (μl) |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| 10 | 100 |
| 20 | 200 |
| 50 | 500 |
| 100 | 1000 |

从悬浮细胞中制备裂解产物

细胞悬液通常可以通过刮除/轻轻移取组织培养瓶中的细胞来制备，或者通过流式细胞仪或其他分离手段分离细胞时进行分选。当细胞被分选或分离为单细胞时，可以确定细胞数量，这有助于选择合适的裂解缓冲液体积来制备细胞裂解产物。

Protocol 示例: 从悬浮细胞中制备裂解产物

1. 对细胞进行计数，并计算出所需细胞数的细胞悬液体积 (见 Table 3)。
2. 在 500 xg 下离心 5-10 分钟 (4 °C) 将细胞富集。
3. 倾倒入上清液，用纸巾轻轻地、小心地拍打试管，以去除试管中残留的任何液体。
4. 将裂解缓冲液 (含蛋白酶抑制剂) 加入到细胞颗粒中，涡旋震荡并在冰上孵育；遵循产品说明书中的说明以实现细胞的完全裂解。

Table 3: 用于细胞裂解的常见体积 (可能因供应商不同而有所差异)

| Cell numbers | Lysis Buffer volume |
|-----------------|---------------------|
| 1×10^6 | 100 μl |
| 2×10^6 | 200 μl |
| 5×10^6 | 500 μl |
| 1×10^7 | 1 ml |

样品中蛋白浓度的标准化

总蛋白浓度应被归一化为 0.5-1mg/mL。请注意，项目中的所有样品都应归一化为相同的蛋白浓度。使用相同的包含蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液调整浓度。大多数标准的总蛋白测量方法 (如 Lowry, Bradford, BCA, Nanodrop 等) 都可以使用。确保该蛋白测量方法与所选择的裂解缓冲液兼容。

联系方式

云生物电话 : +86 21 60523158
云生物邮箱 : yunbios@163.com
如有任何技术问题请联系 :
yunbios@163.com 云生物公众号

